



Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa
Trabalho Final de Mestrado Integrado em Medicina

Lúpus Eritematoso Sistémico, Infecção pelo vírus Epstein-Barr e Linfomagenese

Estudo baseado num caso clínico

Ana Catarina Patrão Correia

Orientador: Dr. Válder R Fonseca

Coordenador: Professor Doutor Rui M M Victorino

Clínica Universitária de Medicina II

2015 / 2016

RESUMO

Introdução: O Lúpus Eritematoso Sistémico (LES) é uma doença autoimune de causa desconhecida onde se verifica lesão de órgão mediada por autoanticorpos e imunocomplexos. O vírus Epstein Barr (EBV) infecta 95% da população de forma latente, mas a sua história natural parece ser diferente nos doentes com LES, podendo estar implicado na etiopatogénese desta doença. Os doentes com LES apresentam um risco aumentado de Linfoma Difuso de Grandes Células B (LDGCB) para o qual a infecção por EBV é também um fator etiopatogénico. Esta tríade clínica pode representar um subgrupo de doentes com características imunopatogénicas particulares.

Caso Clínico: Mulher de 54 anos, com história de Lúpus Eritematoso Sistémico Crioglobulinémia mista tipo II, desenvolve uma massa na face interna da coxa esquerda acompanhada de adenopatias inguinais e lesões ulcerativas genitais. Durante a investigação clínica estabeleceu-se o diagnóstico de LDGCB associado a infecção por EBV. Após quimioterapia foi documentada remissão completa.

Conclusões: O caso apresentado descreve uma clara associação entre o LES, a infecção por EBV e o LDGCB. Os aspetos aqui discutidos sugerem que esta doente após vários anos de estimulação linfocitária e inflamação crónica evoluiu com transformação maligna para um LDGCB, para a qual contribuiu a incapacidade de manutenção da latência da infecção por EBV. Adicionalmente, o estudo deste caso e os dados atualmente disponíveis relativos ao papel patogénico específico da sinalização APRIL nesta tríade abrem hipóteses científicas que poderão motivar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para este grupo particular de doentes.

ABSTRACT

Introduction: Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune disease of unknown cause characterized by organ damage induced by deposition of autoantibodies and immune complexes. The Epstein Barr virus (EBV) infects 95% of general population in latent form, but in SLE patients EBV seems to play a role in etiopathogenesis of the autoimmune process. Patients with SLE have an increased risk of Diffuse Large B Cell Lymphoma (DLBCL) to which EBV infection is also a contributor factor. This triad may represent a subgroup of patients with specific immunopathogenic characteristics.

Case Report: 54-year-old woman with SLE and mixed cryoglobulinemia type II presented with a mass on the inner side of the left thigh associated with inguinal lymphadenopathy and genital ulcerative lesions. During clinical investigation DLBCL associated with EBV infection was diagnosed. After chemotherapy a complete remission was documented.

Conclusion: This case describes an interesting association between SLE, EBV infection and DLBCL, suggesting that this patient after several years of lymphocyte stimulation and chronic inflammation evolved with malignant transformation to a DLBCL. For this process the immune incompetence in maintaining EBV as a latent pathogen was probably an important factor. Recently, a pathological role for APRIL signaling was independently identified in these three conditions. This case point out the hypothesis that APRIL signaling could be an attractive candidate for specific therapies in patients with this clinical triad.

INTRODUÇÃO

Lúpus Eritematoso sistémico

O Lúpus Eritematoso Sistémico (LES) é uma doença autoimune sistémica, que atinge preferencialmente mulheres em idade fértil (ratio mulher/homem de 6,5:1 em crianças e 16,8:1 em adultos, com média de idade no momento do diagnóstico de $28,9 \pm 10,9$ anos)¹, caracterizada pela deposição de autoanticorpos e imunocomplexos diretamente nos tecidos e órgãos ou nos vasos, condicionando indiretamente lesão de órgão por fenómenos de isquémia tecidual². A doença é habitualmente lenta e progressiva, observando-se caracteristicamente uma alternância entre períodos de atividade (exacerbações ou *flares*) e períodos assintomáticos³.

A etiologia e os mecanismos fisiopatológicos do LES ainda não são amplamente conhecidos⁴. Contudo, a ação de hormonas sexuais, alterações no sistema imunitário, fatores ambientais, em especial os agentes microbianos, e genéticos parecem estar envolvidos nesta doença^{2,5}.

A doença apresenta um largo espectro de manifestações clínicas que se encontram influenciadas pela etnia, género, idade, fatores socioeconómicos e tempo de evolução da doença⁵. Os sintomas surgem durante as exacerbações e de forma gradual durante o curso da doença. As primeiras manifestações são inespecíficas (febre, astenia, perda ponderal, anorexia, mialgias)³ mas podem evoluir para manifestações mais específicas e mais graves como a nefrite lúpica e o neuro-lúpus⁶.

Atualmente o diagnóstico de LES é baseado nos critérios propostos, em 2012, pela *Systemic Lupus International Collaborating Clinics*⁶. A terapêutica do LES continua a constituir um enorme desafio clínico². O tratamento deve ser individualizado e orientado pela gravidade e pelos órgãos maioritariamente atingidos. A abordagem terapêutica do LES inclui a administração de antimaláricos e corticóides nas manifestações ligeiras a moderadas e corticóides e imunossuppressores (tais como, metotrexato, azatioprina, micofenolato mucofenil, rituximab e belimumab) nas manifestações moderadas a graves⁶. O prognóstico da doença tem vindo a melhorar graças ao diagnóstico precoce e à otimização do tratamento⁶: atualmente estima-se que a sobrevivência aos 15 anos após o diagnóstico é de 80%³. As causas de morte variam ao

longo da doença: nos primeiros anos a mortalidade é habitualmente consequência direta da doença, mas as infecções oportunistas e as complicações cardiovasculares caracterizam a mortalidade das fases mais avançadas do LES⁶.

Vírus Epstein-Barr

O vírus *Epstein-Barr* (EBV), pertencente à família *Herpesviridae* (género *γ 1-herpesvirus*), é constituído por uma cadeia dupla linear de DNA protegida por uma nucleocápside e por um invólucro de glicoproteínas, e infecta de forma latente cerca de 95% da população saudável⁷. Na grande maioria dos casos a infecção é adquirida durante a infância, tendo uma apresentação subclínica ou assintomática. Contudo, se a infecção for adquirida após a infância desenvolve-se, em 30-70% dos doentes um quadro de mononucleose caracterizado por *rash* cutâneo, exantema no palato, artralgias, astenia, febre, anorexia, cefaleias, insuficiência renal, citopénias, faringite, linfadenopatias, hepatoesplenomegália, podendo nos casos mais graves evoluir para encefalite e meningite⁵.

O EBV é transmitido pela saliva e infecta inicialmente as células epiteliais pavimentosas da orofaringe e nasofaringe⁵. No tecido amigdalino o vírus é transmitido aos linfócitos B, que constituem o principal reservatório humano do EBV⁸. Tal como os restantes vírus desta família, o EBV é caracterizado pela sua capacidade de alternar entre fases de latência (isto é, sem replicação viral) e fases líticas, onde a transcrição do património genético viral é um processo ativo⁹. O programa viral de latência é iniciado após o controlo da primoinfecção com circularização do DNA viral, formando-se um plasmídeo fechado (epissoma) que dificulta a expressão genética das 87 proteínas que codifica^{5,9}. Mas, mesmo nestas fases, pode verificar-se a transcrição de alguns genes virais consoante o estado replicativo das células infetadas. Após a infecção inicial das células epiteliais, o EBV infecta, no tecido amigdalino, os linfócitos B imaturos (CD21⁺), iniciando um programa de crescimento (latência III), com expressão de todas as formas de EBNA (*Epstein Barr Nuclear Antigen*) – EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C e EBNA-LP – e as proteínas LMP (*Latent Transmembrane Proteins*) – LMP-1, LMP-2A e LMP-2B. Os linfócitos B imaturos evoluem para linfócitos B foliculares e, no centro germinativo, o programa de expressão do EBV é modificado, passando a existir apenas expressão de EBNA-1, LMP-1 e LMP-2 (latência

II). O EBNA-1 é o único gene necessário para a manutenção do genoma viral, na forma de epissoma. Por outro lado, a proteína LMP-1 é responsável pela proliferação constitutiva dos linfócitos B e a LMP-2 impede a reativação viral / fase lítica do EBV, garantido a persistência do reservatório viral nos linfócitos B. Após a fase de latência II, os linfócitos B do centro germinativo infectados com EBV evoluem para linfócitos B memória, recirculando entre os tecidos linfóides através da circulação sanguínea, numa fase que é caracterizada pela ausência de expressão de proteínas virais (latência I). O EBV, nestes reservatórios circulantes, sobretudo se evoluírem para plasmócitos, pode reiniciar a fase lítica e, consequentemente, uma infecção secundária^{5,7}. Os fatores precipitantes da reativação viral não são conhecidos mas pensa-se que a diferenciação das células B (de células memória para plasmócitos) pode promover a expressão dos promotores virais. As cópias virais originadas, para além de infetarem outros linfócitos B, infetam novamente os tecidos epiteliais da orofaringe, propiciando o contágio interindividual, através da saliva⁵.

Serologicamente é possível a identificação das várias fases infecciosas do EBV. Após a primoinfecção, surgem os anticorpos IgM EBV-VCA (contra a cápside viral) e os anticorpos IgG EBV-EA/D (contra proteínas envolvidas na replicação viral). Durante as quatro semanas seguintes verifica-se seroconversão de IgM EBV-VCA para IgG EBV-VCA. Os anticorpos IgG EBV-EA/D desaparecem após três a seis meses. Mais tarde, cerca de dois a quatro meses depois, surgem os anticorpos IgG EBNA-1^{7,10}.

Linfoma Difuso de Grandes Células B

O Linfoma Difuso de Grandes Células B (LDGCB) é o linfoma não-Hodgkin mais comum, representando cerca de 30% dos casos¹¹. Esta neoplasia de células B caracteriza-se pelas alterações morfológicas dos linfócitos B clonais, que apresentam um aumento significativo do tamanho nuclear¹². O LDGCB é mais frequente em homens com idade média de 70 anos^{12,13}. As manifestações clínicas do LDGCB são heterogéneas podendo variar desde adenopatias e organomegalias assintomáticas até sintomas sistémicos, como febre, sudorese noturna, fadiga, perda ponderal e anorexia (designados sintomas B). Uma vez que o LDGCB pode surgir em qualquer localização anatómica (mais de 50% dos doentes apresentam doença extranodal no momento do diagnóstico), podem surgir outros sintomas associados ao envolvimento específico de

órgão¹⁴. Em cerca de 15% dos casos ocorre infiltração da medula óssea¹².

Um dos mecanismos carcinogênicos mais conhecidos no LDGCB é a ocorrência de hipermutações somáticas aberrantes, principalmente ao nível dos protooncogenes MYC, PIM1, PAX5 e RhoH/TTF, e de translocações cromossômicas que afetam a função dos genes BCL2, BCL6 e MYC¹². No seu conjunto estas alterações genéticas promovem a sobrevivência celular (e inibição da apoptose) independente da regulação extracelular e, assim, a linfomagenese.

Do ponto de vista clínico, após a documentação diagnóstica, o estadiamento é feito pelo Sistema de Estadiamento de *Ann Arbor* e o prognóstico é definido através do Índice de Prognóstico Internacional (IPI)¹⁴. As opções terapêuticas no LDGCB são complexas, mas na maior parte dos casos a terapêutica de primeira linha, atualmente, corresponde ao esquema R-CHOP (Rituximab associado a Ciclofosfamida, Doxorrubicina, Vincristina e Prednisolona)¹⁵, dada a melhoria do prognóstico após a introdução do anticorpo monoclonal no esquema terapêutico¹⁶.

Apresenta-se de seguida o caso de uma doente com LES que desenvolve um Linfoma Difuso de Grandes Células B associado a infecção por EBV. Este caso ilustra a possível relação fisiopatológica entre estas três entidades clínicas e permite a discussão dos mecanismos de linfomagenese nos doentes com patologia autoimune sistêmica.

CASO CLÍNICO

MCO, sexo feminino, 54 anos, residente em Lisboa. Médica oftalmologista. Um filho saudável.

Observada em consulta de Doenças Autoimunes por aparecimento de uma massa na face interna da coxa esquerda.

Antecedentes Pessoais

Lúpus Eritematoso Sistémico. Diagnosticado aos 17 anos de idade no contexto de investigação clínica do quadro caracterizado por oligoartrite assimétrica migratória, com atingimento preferencial dos joelhos, punhos e mãos; úlceras genitais recorrentes; síndrome febril; fenómeno de Raynaud; telangiectasias periungueais; serosite pleural; e alteração intermitente das transaminases. Na altura foi avaliada laboratorialmente, documentaram-se bicitopénia (anemia e leucolinfopénia); hipocomplementémia (C3 e C4); ANA positivos com padrão fino granular e reforço nucleolar; Anti-SSA/Ro; Anti-SSB/La, e RA teste positivo. **Crioglobulinémia mista tipo II** (IgG policlonal e IgM(k) monoclonal). **Hipercolesterolemia.**

História Ginecológica e Obstétrica: G1P1. Atualmente em menopausa. Sem história de abortos ou outras complicações obstétricas.

Sem **história familiar** relevante.

Medicação Habitual: Prednisolona 5 mg 1id; Hidroxicloroquina 400mg 1id, Cálcio/Vitamina D 1500mg/400U 1id; e Rosuvastatina 10 mg 1id. Sem alergias.

História de Doença Atual: Doente assintomática até três semanas antes de ter recorrido à consulta de Doenças Autoimunes, quando constata o aparecimento insidioso de uma massa na face interna da coxa esquerda, tendo-se verificado, ao longo da semana seguinte o aparecimento de adenopatias inguinais ipsilaterais, bem como de lesões ulcerativas, não supurativas e não hemorrágicas na vulva e no grande lábio esquerdo. A doente negava outras queixas, nomeadamente astenia, febre, sudção, perda ponderal, anorexia, outras tumefações, leucorreia ou outras queixas genitourinárias, bem como comportamentos sexuais de risco.

Exame Objetivo: Doente vígil, apirética, hidratada e corada. Hemodinamicamente estável e eupneica em repouso. Anictérica. Sem alterações da pele ou faneras. Sem

alterações à auscultação cardíaca ou pulmonar. Sem alterações ao exame objetivo abdominal. Na face interna da coxa esquerda palpava-se uma massa de consistência mole, elástica, regular, com cerca de 4x4cm de maiores eixos, móvel em relação aos planos profundos e sem dor ou sinais inflamatórios. Na região inguinal esquerda palpava-se também uma massa com as mesmas características com dimensões 3x4cm. Sem outras adenomegalias. Não foi realizada observação ginecológica, tendo a doente sido referenciada para consulta urgente de Ginecologia.

Perante o quadro apresentado, foi admitido o diagnóstico de Doença Sexualmente Transmissível, nomeadamente Linfogranuloma Venéreo (*C. trachomatis*) ou Infecção Herpética Genital. A doente foi medicada empiricamente com Azitromicina, 1g PO em dose única. Contudo, dado o diagnóstico de LES, foi ainda pedida observação ginecológica urgente, ecografia das partes moles e avaliação analítica, para avaliação de atividade autoimune e de eventual doença linfoproliferativa.

Avaliação Complementar de Diagnóstico

A observação ginecológica não acrescentou novos dados aos já descritos, não tendo sido possível contudo confirmar ou excluir doença sexualmente transmissível, nomeadamente Infecção Herpética Genital.

Na avaliação analítica destacava-se: Hb 13,4g/dL, VGM 78fL; Leucócitos $5,6 \times 10^3$ /L, Neutrófilos 64,0%, Linfócitos 26,3%, Eosinófilos 1,3%, Basófilos 0,5%, Monócitos 7,9%, Plaquetas 457×10^3 /L; Cálcio 10mmol/L; Ureia 47mg/dL, Creatinina 0,9mg/dL; PCR 2,0mg/dL; AST 25U/L, ALT 22U/L, GGT 14U/L, FA 76U/L, Bilirrubina total 0,33mg/dL; LDH 597U/L, β -2-microglobulina 5,56mg/mL; C3 116mg/dL, C4 6mg/dL. Na imunofixação sérica documentou-se a Gamapatia Monoclonal IgM(k) já conhecida, e no estudo autoimunes, verificou-se a manutenção do perfil imunológico da doente, com ANA 1/160 (imunofluorescência com padrão fino granular e reforço nucleolar), Anti-dsDNA negativo, Anti-SSA/Ro positivo, Anti-SSB/La positivo, Anti-Sm negativo, Anti-RNP negativo, Anti-Jo1 negativo, e Anti-Scl 70 negativo. As serologias infecciosas mostraram: CMV IgG e IgM negativas; HSV1 IgG e IgM negativas, HSV2 IgG equívoca e IgM negativa; EBV anti-VCA IgG positiva, anti-VCA IgM negativa e anti-EBNA-1 IgG positiva; TPHA negativo; HIV 1/2 negativo, Ag HIV1 negativo, HCV e HBV negativos.

A Ecografia das Partes Moles revelou “Múltiplas formações ganglionares, inguinais bilateralmente, hipoeecogénicas, mas com manutenção do hilo e do centro lipomatoso não suspeitos e sugestivos de processo reativo locoregional.”

Seguimento e Evolução:

Ao longo da semana seguinte à toma de Azitromicina, observou-se regressão da dimensão das adenopatias inguinais assim como resolução completa das lesões ulcerativas vulvovaginais. Contudo, após uma semana da resolução dos sinais genitais, as adenopatias inguinais e a massa da face interna da coxa reapareceram, com as mesmas características anteriormente descritas. Foi então reavaliada em consulta, tendo sido colocadas as seguintes hipóteses diagnósticas: a) Doença Linfoproliferativa; b) Tuberculose.

Para investigação destas hipóteses diagnósticas foram realizados os seguintes exames complementares de diagnóstico: a) citologia aspirativa das adenopatias inguinais com avaliação microbiológica, b) teste IGRA, c) TAC de corpo, e d) avaliação analítica adicional;

A citologia aspirativa de uma das adenopatias inguinais revelou “lesão inflamatória granulomatosa com necrose central, com coloração de Ziehl-Neelsen negativa”. O teste IGRA foi negativo. A TAC revelou “acentuação ganglionar axilar bilateral, inúmeras adenomegalias retrocraurais até aos territórios inguinais (dimensões máximas de 2,8mm de maior eixo), espessamento e ectasia da última ansa do íleo ao longo de cerca de 15 a 20 cm com espessamento associado do cego e colon ascendente adjacentes, de difícil caracterização” (Figura 1). Da investigação analítica adicional destacava-se: Hb 11,9g/dL, VGM 74,3fL; Leucócitos $6,3 \times 10^3/L$, Neutrófilos 77,9%, Linfócitos 17,2%,; VS 39mm; PCR 2,41mg/dL; LDH 912U/L; IgG 910mg/dL, IgA 196mg/dL, IgM 85mg/dL, IgD 51mg/dL, cadeias kappa 581mg/dL, cadeias lambda 626 mg/dL.

Dado o resultado da TC a doente foi proposta para a realização de biópsia ganglionar excisional e colonoscopia. A biópsia excisional inguinal mostrou “infiltração tecidular por numerosos linfócitos B e T, apresentando os linfócitos B características de malignidade (Figura 2A), com positividade para CD20 (Figura 2B), CD79a, BCL-6, MUM-1 e IgM, mas sem marcação CD10, CD23, CD138 e Ciclina D1, com elevado

índice proliferativo (medido por Ki67), e pesquisa de EBV por FISH positiva em numerosas células” (Figura 2C). Na colonoscopia observou-se uma massa vegetante e estenosante com múltiplas úlceras na região da válvula ileocecal (Figura 3A). O estudo histológico das biópsias efetuadas foi compatível com infiltração por células B malignas com as mesmas características histológicas (Figura 3B) e imunohistoquímicas (Figura 3C) descritas na biópsia ganglionar, nas quais também se documentou a presença de EVB por FISH

Foi assumido o diagnóstico de **Linfoma Difuso de Células Grandes B associado a Infecção por EBV em doente com LES**, em Estadio IV (*Ann Arbor*). A doente iniciou seguimento na consulta de Hematologia, tendo cumprido 8 ciclos de R-CHOP e atingindo remissão completa.

DISCUSSÃO

A tríade LES, Infecção por EBV e Linfoma aqui documentada evoca uma área de intensa investigação clínica, uma vez que questiona os mecanismos etiopatogénicos do LES e a sua relação com a infeção viral por EBV bem como o potencial carcinogénico desta relação, no que respeita à evolução para doença linfoproliferativa.

1. Relação entre Lúpus Eritematoso Sistémico e Infecção por EBV

Muitos estudos têm sido desenvolvidos no sentido de esclarecer a etiologia das doenças autoimunes, nas quais os vírus têm apresentado uma particular importância^{3,17,18}. A infeção por EBV e a etiopatogenia do LES têm sido relacionadas em vários estudos, por isso, a infeção por EBV merece ser estudada em detalhe nos doentes com LES.

Em primeira instância, o quadro sintomático da mononucleose infecciosa e das exacerbações no LES são clinicamente semelhantes, apresentando ambas as entidades manifestações cutâneas, artralgias e mialgias, citopénias, astenia, anorexia e febre. Numa perspetiva mais alargada, podemos afirmar que a história natural do LES e o ciclo de vida do EBV possuem também um padrão semelhante com alternância entre períodos de atividade e períodos sem atividade⁹.

A evidência disponível, em estudos *cohort*, mostra que praticamente todos os doentes com LES são seropositivos para EBV, contrariamente aos controlos saudáveis (99,5% vs. 94,4%, $p = 0,014$)¹⁹. Esta diferença é ainda mais expressiva na idade pediátrica, onde 100% das crianças com LES são seropositivas para EBV (vs. 69,4% nos controlos saudáveis, $p < 0,005$)²⁰. Laboratorialmente identificou-se que os doentes com LES apresentam aberrante expressão de genes de fase latente e de fase lítica – principalmente BLFZ-1, LMP-1 e LMP-2 – ao contrário do que acontece nos indivíduos saudáveis²¹. Foi ainda demonstrado que os doentes com LES apresentam também maior expressão de mRNA viral para genes da fase lítica (BZLF-1) e das fases de latência (LMP-1, LMP-2 e EBNA-1) do EBV²¹. Também os anticorpos anti-EBV encontrados nos doentes com LES sugerem que o EBV se encontra em constante atividade: os doentes apresentam mais frequentemente titulações elevadas de IgG EA (56,7% dos doentes vs. 7,9% dos saudáveis, $p < 0,0001$)²² e IgA EA/D (58% dos doentes vs. 0% dos saudáveis,

$p = 0.0013$)²³. Para além destes dados serológicos exemplificativos, verifica-se também que os doentes com LES apresentam uma virémia mais elevada que pode ser 40 vezes superior à detetada nos controlos saudáveis, por RT-PCR de PBMC. Curiosamente, verifica-se um pico de virémia logo após o início de um *flare*²⁴.

Estes dados, no seu conjunto sugerem a existência de um controlo deficiente da infeção por EBV nos doentes com LES, com predomínio das fases líticas da infeção por EBV. Contudo, estes dados não nos permitem afirmar se a perturbação imunológica induzida pelo EBV é um fator etiológico para o desenvolvimento do LES ou se, por outro lado, as características particulares da infeção por EBV nestes doentes é uma consequência das alterações imunológicas da doença autoimune²⁵.

1.1. Infeção pelo EBV como fator etiopatogénico no LES

Muitos estudos têm documentado que o EBV está implicado na etiopatogénese do LES. Sundar *et al* constataram que ao imunizarem ratinhos com EBNA-1 se verificava o aparecimento de autoanticorpos, nomeadamente anti-dsDNA e anti-Sm, por mecanismos de mimetismo molecular²⁶ e de um fenótipo *lupus-like*²⁷. Outro estudo revelou ainda que os anticorpos anti-SSA/Ro resultam também de fenómenos de mimetismo com o antígeno EBNA-1²⁸. Tendo em conta estes achados, Harley e James levantaram a hipótese dos anticorpos anti-SSA/Ro e anti-Sm, produzidos após o contacto com antígenos virais, serem fatores desencadeadores de autoimunidade, o que aliás é corroborado pela documentação destes autoanticorpos nas fases pré-clínicas do LES²⁹. A relação temporal entre a produção dos anticorpos anti-EBV e dos autoanticorpos, para além das suas semelhanças estruturais e funcionais, parece reforçar o papel do EBV na etiologia do LES, sendo o mimetismo molecular um dos principais mecanismos desta interação.

Tal como referido acima, as manifestações clínicas dos *flares* de LES e de mononucleose infecciosas são semelhantes. Curiosamente os sintomas de *flare* imunológico no LES podem ser atenuados com tratamento com valganciclovir²⁵. Este facto, para além de demonstrar uma interação com significado biológico entre o EBV e a autoimunidade, leva-nos a colocar a hipótese de que os *flares* no LES podem ser precipitados pela reativação do EBV. Contudo, o fator, provavelmente imunológico, que permite a reativação viral não é conhecido⁹.

1.2. Reativação do EBV secundária a outros fatores patogénicos do LES

Vários estudos têm sugerido uma explicação multifatorial para a patogénese do LES. Se por um lado, o EBV pode estar implicado na etiopatogénese do LES, a discrepância entre a prevalência do LES (0,1%)⁹ e a da infecção pelo EBV (95,0%), carece de uma explicação adicional¹⁹. Uma das explicações possíveis é considerar que diferentes patrimónios genéticos influenciam o impacto da infecção pelo EBV no risco de desenvolvimento de doenças autoimunes. Existem na literatura diversos estudos em grandes populações, facilitados pelas novas técnicas de fenotipagem e mapeamento genético que avaliam os polimorfismos de um nucleótido único (SNP), identificando as principais variantes genéticas associadas a várias entidades patológicas. Os estudos GWA – *Genome Wide Association* – para o LES são exemplos deste tipo de análise, onde se têm identificado alterações significativas em polimorfismos nos doentes com LES, nomeadamente nos genes STAT4, BANK1, HLA, IRF5, BLK, IRF8 e ITGAM³⁰. Alguns destes polimorfismos estão relacionados com alterações imunológicas frequentemente descritas nos doentes com LES, como alterações na atividade dos fagócitos, aumento da produção de citocinas, diminuição da atividade do sistema complemento (nomeadamente C1q e C4), hipogamaglobulinémia, neutropénia e linfopénia^{31,9}. Para além de contribuírem para a patogénese da doença autoimune propriamente dita, estas alterações condicionam também um estado de imunossupressão que justifica a maior suscetibilidade destes doentes a várias infeções e a menor capacidade de manutenção de vírus linfotrópicos nas suas fases latentes. De fato, a frequente reativação de outros vírus como o CMV, Parvovirus B19 e vírus da Hepatite B tem, à semelhança do que acontece com o EBV, sido encarada como um possível fator de indução e/ou de promoção desta doença autoimune⁵. *Rasmussen et al.*, demonstraram ainda que os doentes com LES apresentam respostas humorais aberrantes ao EBV, com titulações altas de IgG EA/D, e uma relação entre o aparecimento ou agravamento da linfopenia e a reativação do EBV, o que dificulta a conclusão sobre a relação entre a infecção pelo EBV e o LES, no que concerne ao estabelecimento de um elo de causalidade¹⁷.

2. Linfomagenese no contexto de infecção por vírus linfotrópicos e autoimunidade

2.1 Linfomagenese no LES

O risco aumentado de neoplasias nos doentes com doenças autoimunes é conhecido há várias décadas³². No caso do LES, assiste-se ao aumento da incidência de Linfoma não-Hodgkin³³, principalmente nas suas formas agressivas¹³, sendo mais frequente o desenvolvimento de Linfoma Difuso de Grandes Células B³⁴, no curso da doença autoimune. Uma meta-análise demonstrou que a incidência de Linfoma não-Hodgkin nos doentes com LES é superior comparativamente com a população saudável (SIR 5,7, 95% CI 3,6 – 9,1)³⁵. Na maioria dos casos, o linfoma tem início, em média, 17,8 anos após o diagnóstico do LES³³, mas pode surgir antes dos primeiros sintomas de LES, sendo nestes casos mais indolente³⁴. A associação entre LES e Linfoma não-Hodgkin é mais frequente em homens¹⁵, em doentes de idade avançada e em doentes com mais anos de evolução de LES¹³. Os doentes com LES e Linfoma não-Hodgkin são habitualmente mais novos comparativamente à restante população, com uma idade média na altura do diagnóstico de 55 anos³⁶.

As vias fisiopatológicas desta associação ainda não estão esclarecidas. Contudo, é um fato que nas doenças autoimunes, bem como nas doenças inflamatórias crónicas, existe uma atividade celular proliferativa excessiva que aumenta a probabilidade de ocorrência de erros genéticos potencialmente carcinogénicos, sobretudo nas células do sistema imunitário envolvidas³⁶. Alguns estudos verificaram que translocações cromossómicas com justaposição de oncogenes e outros genes podem estar na origem da linfomagenese associada ao LES³⁶. Um exemplo disto é a hiperexpressão da proteína BCL-2, uma proteína anti-apoptótica, que foi descrita em alguns doentes com LES e que está implicada nas vias carcinogénicas do LDGCB^{11,36}. Reforçando a relação destas duas doenças, *Papadaki H. et al* descreveram um caso de remissão simultânea de LDGCB e de LES com CHOP (Ciclofosfamida, Doxorrubicina, Vincristina, Prednisona)³⁷.

Para além dos fatores imunopatogénicos do LES, outros fatores associados a esta patologia podem contribuir para o risco acrescido de Linfoma não-Hodgkin nestes doentes. Os fármacos usados no tratamento do LES têm sido propostos como causa potencial de carcinogénese³⁸. *Bernatskys et al* observaram um aumento de 2 vezes no risco de Linfoma (Hodgkin e não-Hodgkin) em doentes sob terapêutica com

Ciclofosfamida (SIR=2,80, 95% CI 0,87 - 8,98) e corticóides (SIR= 2,57, 95% CI 0.94 - 7.04)³⁹. Os fármacos podem ser um fator direto de carcinogênese pelo seu efeito citotóxico ou podem promover a atividade replicativa de vírus oncogênicos, como o EBV, pelo seu potencial imunossupressor^{39,40}. A doente apresentada neste caso mantinha-se sob terapêutica imunossupressora há vários anos, pelo que, embora as doses de corticóides fossem baixas, este fator poderá ter contribuído para o desenvolvimento do LDGCB.

2.2 Linfomagenese induzida pela infecção por EBV

O EBV tem sido implicado em várias neoplasias, como por exemplo carcinoma gástrico e nasofaríngeo, sarcoma de partes moles ou linfoma de Burkitt⁴¹. *Jane A et al* descreveram recentemente a ação patogênica deste vírus no LDGCB, atribuindo destaque à proteína LMP-1. A LMP-1 é expressa nas fases de latência III e II, bem como durante a fase lítica e liga-se aos recetores CD40 dos linfócitos B, simulando a ação coestimuladora dos recetores CD40L dos linfócitos T *helper*, promovendo a ativação, diferenciação e proliferação das células B, com consequente risco carcinogénico. Para além da ação direta das proteínas virais, também o mRNA viral apresenta potencial carcinogénico uma vez que inibe a transcrição de fatores pró-apoptóticos. Contudo, apenas 10% dos LDGCB são EBV-positivos, verificando-se esta associação sobretudo em doentes imunodeprimidos e em idosos – apesar desta distribuição epidemiológica estar a mudar⁴². O LDGCB associado ao EBV tem pior prognóstico em comparação com os não associados à infecção por EBV (3 anos de sobrevida: 25% vs. 77,4% respetivamente, $p<0.001$)⁴³.

2.3 Sinalização APRIL na linfomagenese no contexto de infecção por EBV e LES

Recentemente *Löfström B et al* mostraram que no LDGCB associado ao LES, bem como nos linfomas associados ao EBV, é expressa uma elevada concentração da proteína APRIL (cytokine A Proliferating-Inducing Ligand), ao contrário do que acontece, por exemplos, nos casos de LDGCB em doentes com Artrite Reumatóide³⁸. Este achado vem reforçar a existência de uma estreita relação entre estas três entidades clínicas discutidas neste trabalho. O estudo de *Löfström B et al* sugere que a sinalização APRIL pode constituir um mecanismo etiopatogénico específico desta tríade. Em trabalhos anteriores percebeu-se que: a) esta proteína é fundamental para a sobrevivência das células B tumorais (uma vez que, em ensaios *in vitro*, sofrem

apoptose em meios desprovidos de APRIL⁴⁴, o que não se verifica com linfócitos B normais⁴⁵); b) em modelos animais de LES a administração de anticorpos inibidores da sinalização APRIL diminui os títulos de autoanticorpos, bem como a proteinúria e a gravidade da lesão renal, com consequente melhoria da sobrevida⁴⁶.

Desta forma, sabendo que a neutralização da sinalização APRIL (cuja função ainda não é bem conhecida) diminui a proliferação de células B tumorais e melhora vários aspetos imunopatogénicos do LES, é tentador colocar a hipótese da utilização de fármacos com este alvo molecular no tratamento do LDGCB associado à infecção por EBV em doentes com LES.

CONCLUSÃO

É clara a existência de uma estreita relação entre o EBV, o LES e o Linfoma, em particular o LDGCB. No presente caso clínico, esta tríade está bem presente. Os aspetos aqui discutidos sugerem que esta doente após vários anos de estimulação linfocitária e inflamação crónica evoluiu com transformação maligna para um LDGCB, para o qual contribuiu a incapacidade de manutenção da latência da infeção por EBV.

O estudo deste caso e os dados atualmente disponíveis relativos ao papel patogénico específico da sinalização APRIL nesta tríade abrem novas hipóteses científicas que poderão motivar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para este grupo particular de doentes.

AGRADECIMENTOS

Antes de mais tenho que fazer um grande agradecimento à minha família – mãe, pai e avós – porque a pessoa que eu sou hoje deve-se à educação que me transmitiram e à formação que me proporcionaram. Sempre me incentivaram muito para que conseguisse alcançar os meus objetivos, acreditando em mim e acompanhando-me ao longo do meu percurso que, certamente, não teria sido igual sem eles.

Tenho que agradecer também ao Miguel pelo amor, apoio e aconselhamento que me deu ao longo da redação do presente trabalho mas, sobretudo, por estar sempre presente.

Ao Dr. Válter Fonseca por ter aceitado ser meu orientador e por toda a disponibilidade que revelou em apoiar-me desde a primeira reunião, permitindo-me que trabalhasse um tema que estivesse incluído no meu leque de preferências.

E finalmente, mas não menos importante, ao Professor Doutor Rui Vitorino, pela disponibilidade e pela gentileza de me ter possibilitado a realização deste trabalho final de mestrado no seu serviço.

BIBLIOGRAFIA

1. Medeiros C, Bezerra MC, Holanda FN, Braga F, Feija J. Clinical and immunological aspects and outcome of a Brazilian cohort of 414 patients with systemic lupus erythematosus (SLE): comparison between childhood-onset , adult-onset , and late-onset SLE. 2015;1-9.
2. Rajadhyaksha AG, Mehra S, Nadkar MY. Biologics in SLE: the current status. *J Assoc Physicians India*. 2013;61(4):262-267. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24482965>.
3. Esposito S, Bosis S, Semino M, Rigante D. Infections and systemic lupus erythematosus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33(9):1467-1475. doi:10.1007/s10096-014-2098-7.
4. James J a., Robertson J m. Lupus and Epstein-Barr. *Curr Opin Rheumatol*. 2012;24(4):383-388.
5. Draborg AH, Duus K, Houen G. Epstein-Barr Virus and Systemic Lupus Erythematosus. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:1-10. doi:10.1155/2012/370516.
6. Kuhn A, Bonsmann G, Anders H-J, Herzer P, Tenbrock K, Schneider M. The Diagnosis and Treatment of Systemic Lupus Erythematosus. *Dtsch Arztebl Int*. 2015;112(25):423-432. doi:10.3238/arztebl.2015.0423.
7. Füst G. The role of the Epstein-Barr virus in the pathogenesis of some autoimmune disorders - Similarities and differences. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*. 2011;1(4):267-278. doi:10.1556/EuJMI.1.2011.4.2.
8. Niedobitek G, Agathangelou A, Herbst H, Whitehead L, Wright DH, Young LS. Epstein-Barr virus (EBV) infection in infectious mononucleosis: Virus latency, replication and phenotype of EBV-infected cells. *J Pathol*. 1997;182(2):151-159. doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199706)182:2<151::AID-PATH824>3.0.CO;2-3.
9. Draborg AH, Duus K, Houen G. Epstein-Barr virus in systemic autoimmune diseases. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:535738. doi:10.1155/2013/535738.
10. Hanlon P, Avenell A, Aucott L, Vickers M a. Systematic review and meta-analysis of the sero-epidemiological association between Epstein-Barr virus and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(1):R3. doi:10.1186/ar4429.
11. Smedby KE, Baecklund E, Askling J. Malignant Lymphomas in Autoimmunity and Inflammation: A Review of Risks, Risk Factors, and Lymphoma

- Characteristics. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(11):2069-2077. doi:10.1158/1055-9965.EPI-06-0300.
12. de Leval L, Hasserjian RP. Diffuse Large B-Cell Lymphomas and Burkitt Lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2009;23(4):791-827. doi:10.1016/j.hoc.2009.04.004.
 13. Dias C, Isenberg DA. Susceptibility of patients with rheumatic diseases to B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Nat Rev Rheumatol.* 2011;7(6):360-368. doi:10.1038/nrrheum.2011.62.
 14. Longo DL. Malignancies of Lymphoid Cells. In: Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J, eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 18th ed. McGraw-Hill Professional; 2011:2070-2093.
 15. Tarella C, Gueli A, Ruella M, Cignetti A. Lymphocyte transformation and autoimmune disorders. *Autoimmun Rev.* 2013;12(8):802-813. doi:10.1016/j.autrev.2012.11.004.
 16. Kubuschok B, Held G, Pfreundschuh M. Management of Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL). In: Evens AM, Blum KA, eds. *Non-Hodgkin Lymphoma, Cancer Treatment and Research 165.* ; 2015:Pages 271-288. doi:10.1007/978-1-4614-5851-7.
 17. Rasmussen N, Draborg A, Nielsen C, Jacobsen S, Houen G. Antibodies to early EBV, CMV, and HHV6 antigens in systemic lupus erythematosus patients. *Scand J Rheumatol.* 2015;44(2):143-149. doi:10.3109/03009742.2014.973061.
 18. Nelson P, Rylance P, Roden D, Trela M, Tugnet N. Viruses as potential pathogenic agents in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2014;23(6):596-605. doi:10.1177/0961203314531637.
 19. James J a., Neas BR, Moser KL, et al. Systemic lupus erythematosus in adults is associated with previous Epstein-Barr virus exposure. *Arthritis Rheum.* 2001;44(5):1122-1126. doi:10.1002/1529-0131(200105)44:5<1122::AID-ANR193>3.0.CO;2-D.
 20. McClain MT, Poole BD, Bruner BF, Kaufman KM, Harley JB, James JA. An altered immune response to Epstein-Barr nuclear antigen 1 in pediatric systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2006;54(1):360-368. doi:10.1002/art.21682.
 21. Gross a. J, Hochberg D, Rand WM, Thorley-Lawson D a. EBV and Systemic Lupus Erythematosus: A New Perspective. *J Immunol.* 2005;174(11):6599-6607.

- doi:10.4049/jimmunol.174.11.6599.
22. Berkun Y, Zandman-Goddard G, Barzilai O, et al. Infectious antibodies in systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*. 2009;18(13):1129-1135. doi:10.1177/0961203309345729.
 23. Draborg A, Jørgensen J, Müller H. Epstein-Barr virus early antigen diffuse (EBV-EA/D)-directed immunoglobulin A antibodies in systemic lupus erythematosus patients. *Scand J Rheumatol*. 2012;41(4):280-289.
 24. Lossius A, Johansen J, Torkildsen Ø, Vartdal F, Holmøy T. Epstein-Barr Virus in Systemic Lupus Erythematosus, Rheumatoid Arthritis and Multiple Sclerosis—Association and Causation. *Viruses*. 2012;4(12):3701-3730. doi:10.3390/v4123701.
 25. Cuomo L, Cirone M, Di Gregorio AO, et al. Elevated antinuclear antibodies and altered anti-Epstein-Barr virus immune responses. *Virus Res*. 2015;195:95-99. doi:10.1016/j.virusres.2014.09.014.
 26. Sundar K, Jacques S, Gottlieb P, et al. Expression of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 (EBNA-1) in the mouse can elicit the production of anti-dsDNA and anti-Sm antibodies. *J Autoimmun*. 2004;23(2):127-140. doi:10.1016/j.jaut.2004.06.001.
 27. Poole BD, Gross T, Maier S, Harley JB, James JA. Lupus-like autoantibody development in rabbits and mice after immunization with EBNA-1 fragments. *J Autoimmun*. 2008;31(4):362-371. doi:10.1016/j.jaut.2008.08.007.
 28. McClain M, Heinlen L, Dennis G, Roebuck J, Harley J, James J. Early events in lupus humoral autoimmunity suggest initiation through molecular mimicry. *Nat Med*. 2005;11(1):85-89.
 29. Harley JB, James JA. Epstein-Barr virus infection induces lupus autoimmunity. *Bull NYU Hosp Jt Dis*. 2006;64(1-2):45-50.
 30. Ruiz-larrañaga O, Migliorini P, Uribarri M, et al. Genetic association study of systemic lupus erythematosus and disease subphenotypes in European populations. 2016. doi:10.1007/s10067-016-3235-8.
 31. Bosch X, Guilabert A, Pallarés L, Cervera R, Ramos-Casals M, Bové A et al. Infections in systemic lupus erythematosus: a prospective and controlled study of 110 patients. *Lupus*. 2006;15:584-589.
 32. Kojima M, Itoh H, Shimizu K, et al. Malignant lymphoma in patients with systemic rheumatic disease (rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus,

- systemic sclerosis, and dermatomyositis): a clinicopathologic study of 24 Japanese cases. *Int J Surg Pathol.* 2006;14(1):43-48. doi:10.1177/106689690601400108.
33. King JK, Costenbader KH. Characteristics of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and non-Hodgkin's lymphoma (NHL). *Clin Rheumatol.* 2007;26(9):1491-1494. doi:10.1007/s10067-006-0532-7.
 34. Knight JS, Blayney DW, Somers EC. Patients with systemic lupus erythematosus and haematological malignancy at a tertiary care centre: timing, histopathology and therapy. *Lupus Sci Med.* 2014;1(1):e000051-e000051. doi:10.1136/lupus-2014-000051.
 35. Apor E, O'Brien J, Stephen M, Castillo JJ. Systemic lupus erythematosus is associated with increased incidence of hematologic malignancies: A meta-analysis of prospective cohort studies. *Leuk Res.* 2014;38(9):1067-1071. doi:10.1016/j.leukres.2014.06.025.
 36. Bernatsky S. Non-Hodgkin's lymphoma in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2005;64(10):1507-1509. doi:10.1136/ard.2004.034504.
 37. Papadaki HA, Xylouri I, Katrinakis G, et al. Non-Hodgkin's Lymphoma in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Leuk Lymphoma.* 2003;44(2):275-279. doi:10.1080/1042819021000030045.
 38. Lofstrom B, Backlin C, Pettersson T, Lundberg IE, Baecklund E. Expression of APRIL in Diffuse Large B Cell Lymphomas from Patients with Systemic Lupus Erythematosus and Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol.* 2011;38(9):1891-1897. doi:10.3899/jrheum.101190.
 39. Bernatsky S, Ramsey-Goldman R, Joseph L, et al. Lymphoma risk in systemic lupus: effects of disease activity versus treatment. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(1):138-142. doi:10.1136/annrheumdis-2012-202099.
 40. Tessier-Cloutier B, Clarke AE, Ramsey-Goldman R, Gordon C, Hansen JE, Bernatsky S. Systemic Lupus Erythematosus and Malignancies. *Rheum Dis Clin North Am.* 2014;40(3):497-506. doi:10.1016/j.rdc.2014.04.005.
 41. Taylor GS, Long HM, Brooks JM, Rickinson AB, Hislop AD. The Immunology of Epstein-Barr Virus-Induced Disease. *Annu Rev Immunol.* 2015;33(1):787-821. doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112326.
 42. Healy JA, Dave SS. The Role of EBV in the Pathogenesis of Diffuse Large B Cell Lymphoma No Title. In: Münz C, ed. *Epstein Barr Virus Volume 1, Current*

- Topics in Microbiology and Immunology* 390. ; 2015:315-337.
43. Song C-G, Huang J-J, Li Y-J, et al. Epstein-Barr Virus-Positive Diffuse Large B-Cell Lymphoma in the Elderly: A Matched Case-Control Analysis. *PLoS One*. 2015;10(7):e0133973. doi:10.1371/journal.pone.0133973.
 44. Guadagnoli M, Kimberley FC, Phan U, et al. Development and characterization of APRIL antagonistic monoclonal antibodies for treatment of B-cell lymphomas. *Blood*. 2011;117(25):6856-6865. doi:10.1182/blood-2011-01-330852.
 45. Varfolomeev E, Kischkel F, Martin F. APRILdeficient mice have normal immune system development. *Mol Cell Biol*. 2004;24(3):997-1006.
 46. Huard B, Tran NL, Benkhoucha M, Manzin-Lorenzi C, Santiago-Raber ML. Selective APRIL blockade delays systemic lupus erythematosus in mouse. *PLoS One*. 2012;7(2):1-8. doi:10.1371/journal.pone.0031837.

FIGURAS

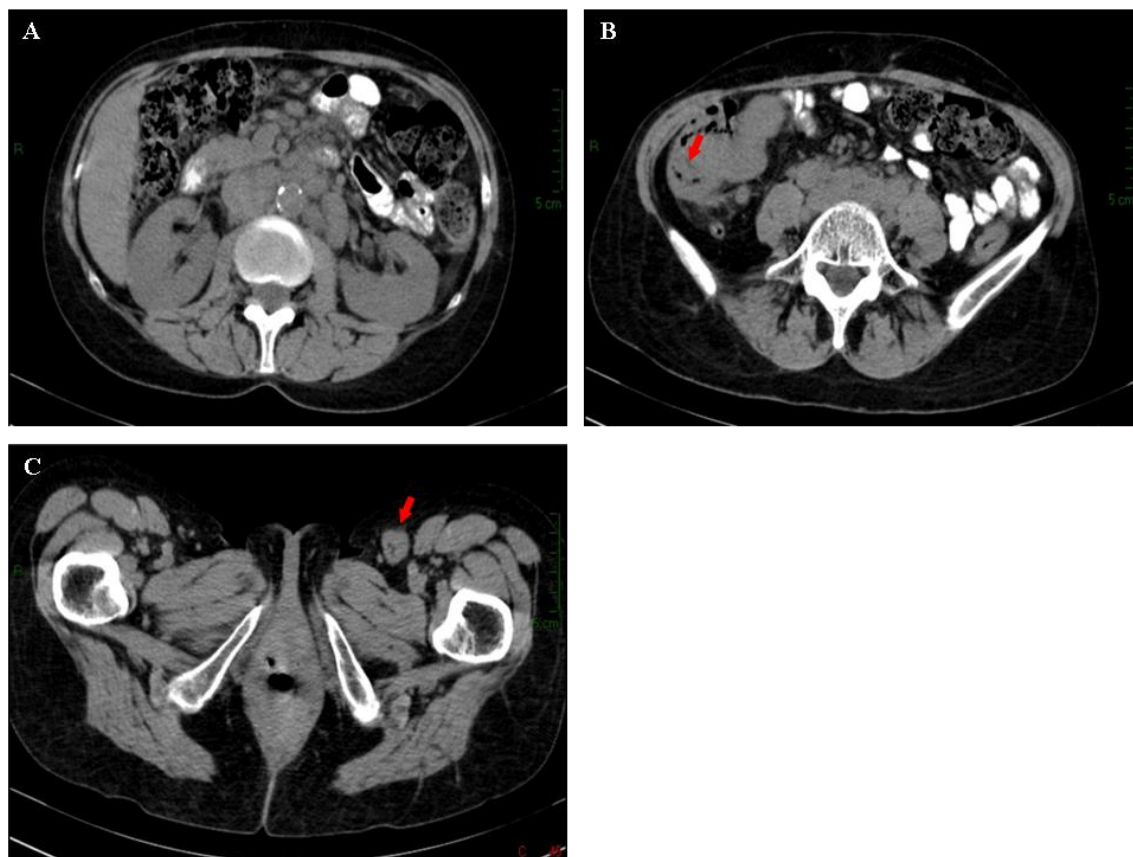


Figura 1. Adenomegalias múltiplas em vários territórios ganglionares e envolvimento intestinal na TC de Corpo. A. Inúmeras adenomegalias retrocrurais e abdominopélvicas. **B.** Espessamento e ectasia da última ansa do íleo (seta) ao longo de cerca de 15 a 20cm com espessamento do cego e cólon ascendente adjacentes. **C.** Adenopatias inguinais bilaterais com preservação do centro lipomatoso central dos nódulos linfáticos (seta), aspeto imagiológico sugestivo de processo reativo.

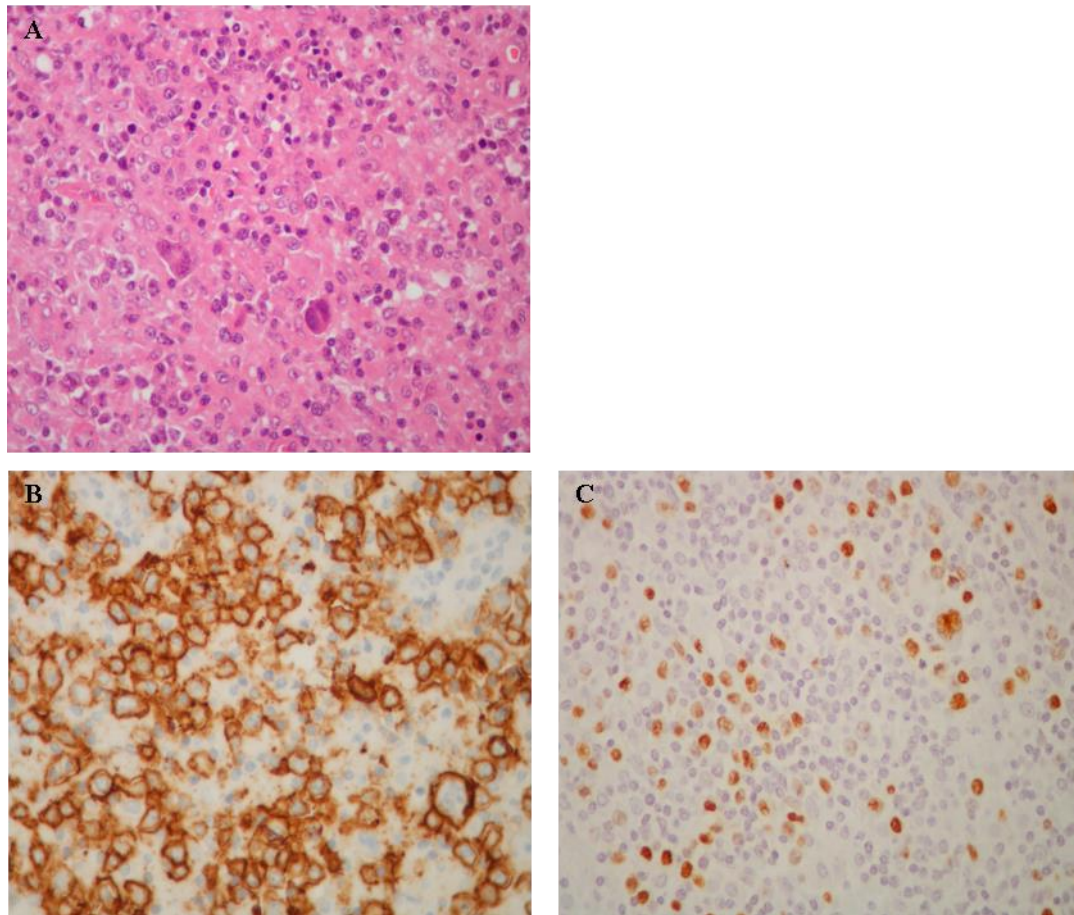


Figura 2. Linfoma Difuso de Grandes Células B com FISH positiva para EBV. A. Gânglio linfática de estrutura apagada por proliferação linfóide difusa, com células grandes, com morfologia de centroblastos, por vezes multinucleadas, Reed-Stenberg-like (HE, x200). **B.** As células neoplásicas são imunorreativas para CD20 e MUM-1 e negativas para CD10, CD23, CD5, CD30, Ciclina D e Bcl6 duvidoso (CD20, x200). **C.** A pesquisa de EBV por hibridação *in-situ* foi positiva em numerosas células (EBV, x200).

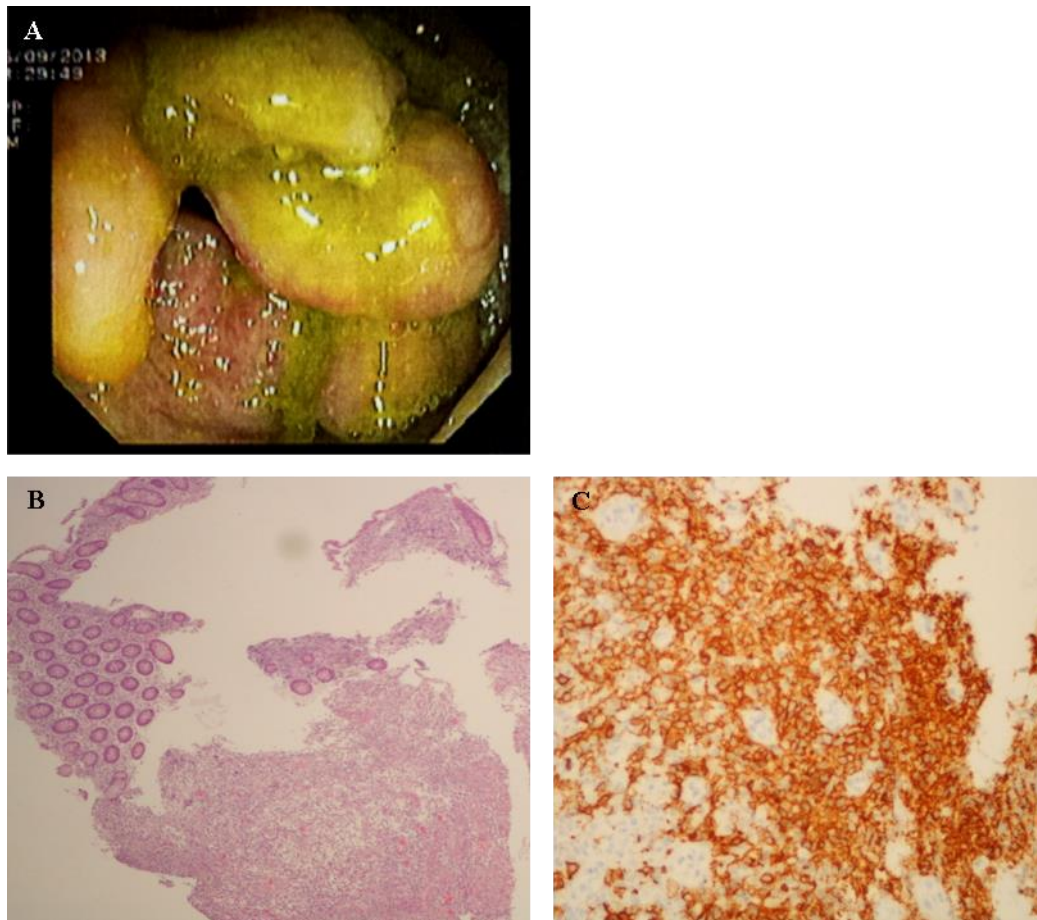


Figura 3. Envolvimento intestinal por Linfoma Difuso de Grandes Células B. **A.** Lesão vegetante da válvula ileocecal (colonoscopia). **B.** Mucosa da porção distal do intestino com ulceração, com zonas onde se reconhece proliferação linfóide difusa por células B, com morfologia de centroblastos (HE, x10). **C.** As células neoplásicas são imunorreativas para CD20, CD79a, Bcl6, MUM-1 e IgM, e negativas para CD10, CD23, CD138 e Ciclina D (CD20, x200).